

日 本 国 特 許 庁

JAPAN PATENT OFFICE

12.03.03

3

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年 3月12日

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-066814

[ ST.10/C ]:

[ JP2002-066814 ]

出 願 人

Applicant(s):

株式会社ヤトロン

REC'D 09 MAY 2003

WIPO

PCT

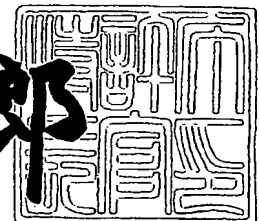
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 4月22日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3028847

【書類名】 特許願

【整理番号】 IAT02001P

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12Q 1/00

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都千代田区東神田1丁目11番4号 株式会社ヤトロン内

    【氏名】 藤井 隆行

【特許出願人】

    【識別番号】 000138277

    【氏名又は名称】 株式会社ヤトロン

【代理人】

    【識別番号】 100090251

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 森田 憲一

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 017813

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

    【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 アラニンアミノトランスフェラーゼ活性測定試薬

【特許請求の範囲】

【請求項1】 L-アラニン、2-オキソグルタル酸、乳酸脱水素酵素、及び還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを含むアラニンアミノトランスフェラーゼ活性測定試薬において、  
乳酸脱水素酵素活性に対する阻害作用を有する物質を、更に含むことを特徴とする、前記アラニンアミノトランスフェラーゼ活性測定試薬。

【請求項2】 乳酸脱水素酵素活性に対する阻害作用を有する物質が、オキサミン酸又はその塩である、請求項1に記載のアラニンアミノトランスフェラーゼ活性測定試薬。

【請求項3】 アラニンアミノトランスフェラーゼを含有する可能性のある被検試料と、L-アラニン、2-オキソグルタル酸、乳酸脱水素酵素、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、及び乳酸脱水素酵素活性に対する阻害作用を有する物質とを接触させることを特徴とする、アラニンアミノトランスフェラーゼ活性の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、アラニンアミノトランスフェラーゼ活性測定試薬に関する。

【0002】

【従来の技術】

アラニンアミノトランスフェラーゼ（以下、ALTと略称する）は、心臓や肝に多く分布する酵素であり、各種疾患時に血中に遊出されるので、尿や血液等の生体液中ALT活性の測定は、心疾患又は肝疾患の診断や治療の経過観察の指標として重要な項目の一つである。

【0003】

ALT活性の測定法としては、L-アラニン及び2-オキソグルタル酸を基質として、ALTによって生成されるピルビン酸を乳酸脱水素酵素（以下、LDと

略称する) によって乳酸に変え、共存させておいた還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (以下、NADHと略称する) 量の減少量を、波長340nm付近で測定することによりALT活性を測定する方法が汎用されている。

## 【0004】

この反応式を示せば、以下のとおりである。

## A L T

L-アラニン + 2-オキソグルタル酸 → L-グルタミン酸 + ピルビン酸

## L D

ピルビン酸 + NADH → 乳酸 + NAD

なお、前記式中で、NADは酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドである。

## 【0005】

先に述べたとおり、ALT活性測定は、心疾患又は肝疾患の診断や治療の経過観察の指標として重要な項目の一つであるため、国際的に測定されている。しかし、ALT活性の測定法は各種知られており、いろいろな測定法が用いられているため、施設間や測定者間で測定値が異なり、その測定値の互換性がとりずらく、臨床的な診断に支障をきたす恐れがある。そのため、各国において、反応原理、試薬組成、及び試薬濃度等を規定した勧告法が提唱されており、勧告法で求められた測定値と互換性が得られるよう、各施設においてALT活性測定が行われるようになってきた。

## 【0006】

日本でも日本臨床化学会(JSCC)が1989年にALT活性測定の勧告法を公表している[日本臨床化学会: ヒト血清中酵素活性測定の勧告法—アラニンアミノトランスフェラーゼ(1989-08-30), 臨床化学, 18(4), 250-262(1989)]。

日本臨床化学会の公表した前記勧告法は、測定値の互換性を取るために、臨床検査室等の技術レベルで共有することのできる共通の酵素活性測定を最適な条件で測定する方法であるため、一般には日常の検査法として使用することのできる

ものではない。そこで、臨床検査薬メーカーは、日本臨床化学会の勧告法と測定値との互換性が取れるような試薬を提供している。そして、日本臨床化学会の勧告法と測定値との互換性が取れることを前提に、正確で、精密な測定値を得られるような、より安定で、安価な試薬を提供しようと日々努力している。

#### 【0007】

##### 【発明が解決しようとする課題】

このように、臨床検査室等のALT活性測定を行なっている施設では、日常の検査法として日本臨床化学会の勧告法と測定値との互換性が取れるような臨床検査薬メーカーの提供するALT活性測定試薬を使用しているのが一般的である。しかしながら、生体試料は多種類の成分の混合物であり、また、ALT活性測定試薬も多種類の成分の混合物であることから、試薬の安定化や夾雑物の影響を受けないようなALT活性測定試薬の開発は極めて困難である。

#### 【0008】

特に、測定試薬をセットし、条件を設定するだけで自動的に測定する自動分析機と呼ばれている分析装置では、数週間に渡り蓋を開けたまま放置して測定することが多く、この場合、大気中の二酸化炭素を吸収し、ALT活性測定試薬のpHが変化し、試薬ブランク反応も変わり、得られるALT活性測定値に誤差が発生する問題点があった。

#### 【0009】

従って、本発明の課題は、試薬ブランク反応の上昇、すなわち、初期吸光度の上昇を抑制することのできるALT活性測定試薬を提供することにある。

#### 【0010】

##### 【課題を解決するための手段】

前記課題は、本発明による、L-アラニン、2-オキソグルタル酸、乳酸脱水素酵素、及び還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを含むアラニンアミノトランスフェラーゼ活性測定試薬において、乳酸脱水素酵素活性に対する阻害作用を有する物質を、更に含むことを特徴とする、前記アラニンアミノトランスフェラーゼ活性測定試薬により解決することができる。

また、本発明は、アラニンアミノトランスフェラーゼを含有する可能性のある

被検試料と、L-アラニン、2-オキソグルタル酸、乳酸脱水素酵素、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、及び乳酸脱水素酵素活性に対する阻害作用を有する物質とを接触させることを特徴とする、アラニンアミノトランスフェラーゼ活性の測定方法に関する。

## 【0011】

## 【発明の実施の形態】

本発明のALT活性測定試薬は、L-アラニン、2-オキソグルタル酸、LD、及びNADHを含む公知のALT活性測定試薬の改良試薬である。L-アラニン、2-オキソグルタル酸、LD、及びNADHを含むALT活性測定試薬では、L-アラニン及び2-オキソグルタル酸を基質として、ALTによって生成されるピルビン酸をLDによって乳酸に変え、共存させておいたNADH量の減少量を、波長340nm付近で測定することにより、ALT活性を測定することができる。

## 【0012】

本発明のALT活性測定試薬は、これらの公知の構成成分に加え、LD活性に対する阻害作用を有する物質（以下、LD阻害剤と称する）を含む。本発明で用いるLD阻害剤としては、特に限定されるものではないが、例えば、オキサミン酸、シュウ酸、オキサロ酢酸、ピルビン酸、ホスホエノールピルビン酸、ドデシル硫酸ナトリウム、乳酸、若しくはヒドロキシグルタル酸、又はそれらの塩を用いることができ、ALT活性測定に誤差を与えることがない点で、オキサミン酸又はその塩（例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、又はリチウム塩）が好ましい。

## 【0013】

本発明のALT活性測定試薬に含有されるLD阻害剤の濃度は、使用するLD阻害剤の種類により変化するので、ALT活性測定試薬に影響を与えないLD活性が存在する濃度である限り、特に限定されるものではないが、一般的には、測定系における終濃度が0.001~100mmol/Lとなるように、測定試薬中の含有濃度を調整して用いることができる。

## 【0014】

「ALT活性測定試薬に影響を与えないLD活性が存在する」とは、被検試料中のALT活性を測定するために最低必要なLD活性が少なくとも残存していることを意味し、LD阻害剤によりLD活性が阻害されても最低必要量のLD活性が残存していれば、ALT活性測定試薬としては問題にはならない。更に、本発明の目的は試薬ブランク反応を抑制することにあるので、ALT活性測定試薬に影響を与えないLD活性を有し、しかも、試薬ブランク反応がなるべく小さくなるような、LD添加量及びLD阻害剤量の組み合わせを適宜設定すればよい。

## 【0015】

より具体的には、例えば、LD阻害剤としてオキサミン酸を用いる場合には、測定系における終濃度が、好ましくは0.005～5mmol/L、より好ましくは0.02～1mmol/Lとなる量で添加することにより、期待される効果を得ることができる。後述するように、試薬構成を第一試薬と第二試薬とに分ける場合においても、終濃度が前記と同様であれば、第一試薬又は第二試薬のいずれか一方に、あるいは、両方に添加しても同様の効果を得ることができる。また、LD阻害剤をLDと共存させることにより、LDを安定化させる効果も併せて得ることができる。

## 【0016】

本発明のALT活性測定試薬に含有される構成成分の内、公知のALT活性測定試薬に含まれる各種成分、すなわち、LD、NADH、L-アラニン、及び2-オキシグルタル酸については、公知のALT活性測定試薬と同様に用いることができる。

## 【0017】

例えば、LDとしては、例えば、ニワトリ心臓由来、ブタ心臓由来、ブタ筋肉由来、若しくはロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) 由来の天然型LD、又はそれらの組換え型LDを用いることができ、その由来は特には限定されない。

また、本発明のALT活性測定試薬に含有されるLDの濃度は、測定系における終濃度が、少なくとも100U/L以上となるように、適宜選択して用いることができる。なお、本発明のALT活性測定試薬はLD阻害剤を更に含むことを

特徴としているので、LD阻害剤によるLD阻害分を考慮し、終濃度活性が少なくとも100U/L以上となるように、適宜選択して用いることができる。例えば、LD阻害剤としてオキサミン酸を0.02~1mmol/Lとなる量で添加する場合においても、終濃度活性が少なくとも100U/L以上となるように、適宜選択して用いることができる。

なお、本明細書において「LD活性」とは、ピルビン酸を乳酸に還元する活性を意味する。また、その単位「U」は、1分間に1 $\mu$ molの基質（ピルビン酸）を生成物（乳酸）に転換する酵素活性の量（標準温度は30℃）で定義される。

#### 【0018】

本発明のALT活性測定試薬に含有されるNADHの濃度は、測定系における終濃度が、好ましくは0.05~2mmol/L、より好ましくは0.1~0.5mmol/Lとなる範囲で使用する事ができる。

基質であるL-アラニンの濃度は、測定系における終濃度が、好ましくは100~3000mmol/L、より好ましくは200~2000mmol/Lとなる範囲で使用する事ができる。

また、もう一つの基質である2-オキソグルタル酸の濃度は、測定系における終濃度が、好ましくは1~500mmol/L、より好ましくは5~100mmol/Lとなる範囲で使用する事ができる。

#### 【0019】

本発明のALT活性測定試薬は、公知のALT活性測定試薬と同様に、適当な緩衝剤を更に含むことができ、前記緩衝剤としては、ALT活性測定への悪影響がない限り、従来公知の緩衝液を適宜選択して使用することができる。具体的には、例えば、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、リン酸、2-[4-（2-ヒドロキシエチル）-1-ピペラジル]エタンスルホン酸、ビス（2-ヒドロキシエチル）イミノトリス（ヒドロキシメチル）メタン、2-ヒドロキシ-N-トリス（ヒドロキシメチル）メチル-3-アミノプロパンスルホン酸、N-トリス（ヒドロキシメチル）メチル-2-アミノエタンスルホン酸、又はn-エチルモルフォリン等を使用することができる。



更に、本発明の A L T 活性測定試薬は、前記必須配合成分及び緩衝剤の他に、必要により、一般的に添加される成分、例えば、キレート剤〔例えば、エチレンジアミン四酢酸（E D T A）等〕、防腐剤（例えば、アジ化物等）、安定化剤（例えば、アルブミン又はグリセロール等）、及び／又は各種界面活性剤等を適宜添加することができる。

## 【 0 0 2 0 】

本発明の A L T 活性測定試薬の試薬構成は、公知の A L T 活性測定試薬と同様に、特に限定されるものではなく、例えば、1 試薬にまとめることもできるし、あるいは、2 試薬以上の試薬構成とすることもできるが、一般的には、各構成成分が安定な条件に分け、活性測定に至適な条件にて反応することができる試薬構成にすることが好ましい。このような試薬構成としては、例えば、アルカリ性で安定な N A D H 及び L D 等を含む第一試薬と、2-オキシグルタル酸等を含む第二試薬とに分け、反応時に活性測定に至適な試薬濃度及び p H になるようにこれらの各試薬を構成し、更に、第一試薬又は第二試薬のいずれか一方、あるいは、両方に、L D 阻害剤及び L-アラニンを添加することができるが、これに限定されるものではない。

## 【 0 0 2 1 】

また、被検試料として、ピルビン酸を含有する可能性のある被検試料（例えば、血液、血清、血漿、若しくは尿等の体液、又は細胞組織等）を測定する場合には、被検試料由来のピルビン酸の影響を排除するために、少なくとも L D を第一試薬として含有し、2-オキシグルタル酸を第二試薬として含有する 2 試薬系とすることが好ましい。ピルビン酸を含有する可能性のある被検試料と、L D を含む第一試薬とを混合し、被検試料由来のピルビン酸を消去した後、第二試薬を添加することにより、被検試料由来のピルビン酸の影響を受けることなく、A L T 活性を測定することができる。

なお、少なくとも L D 及び 2-オキシグルタル酸を第二試薬として含有する 2 試薬系であっても、第二試薬添加後、例えば、数十秒から 1 分間程度で被検試料由来のピルビン酸を消去した後、A L T 活性を測定することができるし、あるいは、1 試薬系であっても同様の目的を果たすことができ、従って、本発明の A L

T 活性測定試薬は、特定の試薬構成に限定されるものではない。

#### 【0022】

本発明の A L T 活性測定試薬は、例えば、本発明の A L T 活性測定方法に用いることができる。本発明の A L T 活性測定方法では、被検試料と、L-アラニン、2-オキソグルタル酸、LD、NADH、及びLD阻害剤とを接触させ、NADH量の減少量を、波長340nm付近で測定することにより、A L T 活性を測定することができる。

前記被検試料は、A L T 活性を含有する可能性のある被検試料である限り、特に限定されるものではなく、例えば、臨床診断に一般的に用いられる生体由来液、例えば、血液、血清、血漿、若しくは尿、又は細胞組織、あるいは実験サンプルなどを挙げることができる。

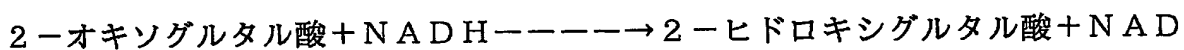
#### 【0023】

##### 【作用】

本発明者は、本発明の A L T 活性測定試薬において、試薬ブランク反応が抑制される理由を、以下の作用によるものと考えている。なお、本発明は、以下の推論に限定されるものではない。

本発明の A L T 活性測定試薬に含まれるLDは、主たる酵素活性である乳酸に対する脱水素酵素活性に加え、2-オキソグルタル酸を還元する活性、すなわち、2-ヒドロキシグルタル酸脱水素酵素（HGD）活性を有することが知られている〔臨床化学，18（4），250-262（1989）〕。この反応を示せば、以下のとおりである。

##### HGD



#### 【0024】

従来技術欄で先述したように、日本臨床化学会の公表した勧告法も含め、汎用されているA L T 活性測定は、基質として2-オキソグルタル酸を用いているため、LDが2-オキソグルタル酸に対する脱水素酵素活性（すなわち、HGD活性）を有すると、NADHを酸化し、試薬ブランクや試薬ブランク反応を大きく

してしまう。

また、2-オキソグルタル酸に対する脱水素酵素活性は、pH変化により酵素活性が変化してしまい、得られるALT活性測定値に誤差が発生する。例えば、測定試薬をセットし、条件を設定するだけで自動的に測定する自動分析機と呼ばれている分析装置では、数週間に渡り蓋を開けたまま放置して測定することが多く、大気中の二酸化炭素を吸収し、ALT活性測定試薬のpHが変化し、試薬ブランク反応も変わり、得られるALT活性測定値に誤差が発生する。

更に、2-オキソグルタル酸に対する脱水素酵素活性の存在は、ALT活性測定でピルビン酸に対するLDの見かけのKm上昇をきたし、活性測定値への負の誤差を与えることが問題となっている。ここで起きる試薬ブランク反応は、LD自体が示す2-オキソグルタル酸を還元する反応、すなわち、HGD活性であると考えられる。

#### 【0025】

本発明者が確認したところ、LD中にHGD活性が存在し、ALT活性測定試薬に添加されているLD量に依存して試薬ブランクも変化する。また、HGD活性は、弱酸性から中性付近に至適pHを持っている。例えば、LD量を増やせば、試薬ブランクも大きくなるほか、弱アルカリ性条件下でALT活性を測定する場合、試薬容器開封保存後の試薬pH低下により試薬ブランクが大きくなってしまい、正確なALT活性測定値を得ることができない。

試薬ブランクを小さくするには、LD量を少なくすることが考えられるが、LD量が少なすぎると、ALT活性測定を測定するための必要なLD量が不足し、定量性が得られなくなってしまう。また、試薬容器開封保存後の試薬pH低下による試薬ブランク上昇は、ALT活性測定時のpHをアルカリ性に移動することにより、試薬ブランクを回避できるが、ALT活性の至適pHは弱アルカリ性であるので、適当な方法とは言えない。

#### 【0026】

従来、HGD活性の阻害剤は全く知られておらず、このような状況下、本発明者は、公知のALT活性測定試薬にLD阻害剤を添加することにより、LD自体が示すHGD活性を阻害し、その結果、定量性が損なわれることなく、試薬ブ

ンクを小さくし、試薬容器開封保存後の試薬 pH 低下による試薬ブランク上昇の回避や、ピルビン酸に対する LD の見かけの  $K_m$  上昇による ALT 活性測定値への負の誤差を低減することができたものと考えている。

【0027】

【実施例】

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【調製実施例 1】

本発明の ALT 活性測定試薬として、表 1 に示す組成からなる第一試薬と、表 2 に示す組成からなる第二試薬とからなる 2 試薬系試薬を調製した。

また、比較用の従来公知の ALT 活性測定試薬として、第一試薬中にオキサミン酸を含まないこと以外は、前記第一試薬と前記第二試薬と同じ組成からなる 2 試薬系試薬を調製した。

以下、比較用の前記 2 試薬系試薬を「試薬 A」と称し、本発明の前記 2 試薬系試薬を「試薬 B」と称する。調製した試薬 A 及び試薬 B は、以下の評価例で使用するまで、それぞれ、密封可能な容器に入れ、密封状態で保存した。

【0028】

《表 1》

濃度	含有成分
20 mmol/L	Tris-塩酸 (pH 9.20)
200 mmol/L	L-アラニン
0.5 mmol/L	オキサミン酸
0.095 %	アジ化ナトリウム
0.25 mmol/L	NADH
3 KU/L	LD (組換型 LD ; オリエンタル酵母工業株式会社製)

【0029】

《表 2》

濃度	含有成分
----	------

3 6 0 m m o l / L	T r i s - 塩 酸 ( p H 4 . 5 0 )
1 0 8 0 m m o l / L	L - ア ラ ニ ン
6 3 m m o l / L	2 - オ キ ソ グ ル タ ル 酸
0 . 0 1 %	E D T A 2 N a

---

## 【 0 0 3 0 】

## 【 評 価 例 1 】

## 《 本 発 明 の A L T 活 性 測 定 試 薬 の 評 価 》

## ( 1 ) 試 薬 ブ ラ ン ク の 測 定

前記調製実施例 1 で調製した比較用の試薬 A の第一試薬 6 0 m L 及び第二試薬 2 0 m L、並びに本発明の試薬 B の第一試薬 6 0 m L 及び第二試薬 2 0 m L を、それぞれ、自動分析装置 ( 7 1 7 0 S ; 株式会社日立製作所製 ) 用の試薬容器に充填し、これらの試薬容器を自動分析装置にセットし、5 週間放置した。評価中の自動分析装置は、試薬容器がセットされている部分には冷却装置が付いており、約 1 0 ℃ に保たれている。また、試薬容器の蓋は開けた状態のままにした。

放置直後、1 週間経過後、2 週間経過後、3 週間経過後、4 週間経過後、及び 5 週間経過後に、それぞれ、以下の手順に従って、試薬 A 及び試薬 B の試薬ブランクを測定した。

## 【 0 0 3 1 】

より具体的には、自動分析装置の反応セルに、検体として生理食塩水 7 . 5  $\mu$  L を加えたところに、第一試薬 1 5 0  $\mu$  L を加えて攪拌し、3 7 ℃ で 5 分間加温した後、第二試薬 5 0  $\mu$  L を加えて攪拌し、更に 3 7 ℃ で 5 分間加温した。第二試薬を添加してから約 1 分経過後から 5 分経過後まで ( すなわち、4 分間 ) の波長 3 4 0 n m における吸光度変化量を測定し、1 分間当たりの吸光度変化量を算出し、ブランク感度とした。結果を図 1 に示す。

図 1 に示すように、蓋を開けた状態で放置しておくと、比較用の試薬 A では、試薬ブランクが経時的に上昇していくのに対して、本発明の試薬 B では、試薬ブランクがほとんど変化しなかった。

## 【 0 0 3 2 】

## (2) プール血清におけるALT活性の測定

前記評価例1(1)と同様に、前記調製実施例1で調製した試薬A及び試薬Bを5週間放置した。放置直後、1週間経過後、2週間経過後、3週間経過後、4週間経過後、及び5週間経過後に、それぞれ、以下の手順に従って、検体(プール血清)中のALT活性を測定した。

すなわち、プール血清又は生理食塩水(試薬ブランク)7.5 $\mu$ Lに第一試薬150 $\mu$ Lを加えて攪拌し、37 $^{\circ}$ Cで5分間加温した後、第二試薬50 $\mu$ Lを加えて攪拌し、更に37 $^{\circ}$ Cで5分間加温した。第二試薬を添加してから約1分経過後から5分経過後まで(すなわち、4分間)の波長340nmにおける吸光度変化量を測定し、1分間当たりの吸光度変化量を算出した。ALT活性は、プール血清の代わりに、酵素キャリブレーター(国際試薬株式会社製)を用いて得られた測定結果に基づいて、換算した。

## 【0033】

結果を図2に示す。図2に示すように、プール血清の測定値に関しても、蓋を開けた状態で放置しておく、比較用の試薬Aでは、ALT活性測定値が経時的に上昇していくのに対して、本発明の試薬Bでは、ALT活性測定値の変動がほとんど見られなかった。

## 【0034】

## 【評価例2】

《本発明のALT活性測定試薬におけるLDの安定性に関する評価》

本評価例では、前記調製実施例1で調製した比較用の試薬Aの第一試薬60mL及び本発明の試薬Bの第一試薬60mLを、それぞれ、70mL容の蓋付きポリエチレン製瓶に密封し、25 $^{\circ}$ C又は37 $^{\circ}$ Cにて3週間保管し、各第一試薬中に含まれるLD活性の残存率の経時変化を調べた。

具体的には、保存直後、並びに保管開始から1週間経過後、2週間経過後、及び3週間経過後に、それぞれ、各試薬を採取し、測定時に各試薬を0.1%ウシ血清アルブミン含有50mmol/Lリン酸緩衝液(pH7.50)にて1/10濃度に希釈したものを検体とし、以下の手順に従って、自動分析装置(7170S; 株式会社日立製作所製)を用いて実施した。

## 【0035】

検体 7.5  $\mu$ L に、LD 活性測定試薬 1 [50 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.50) 及び 0.25 mmol/L -NADH] 150  $\mu$ L を加え、37℃ で 5 分間加温した後、LD 活性測定試薬 2 [50 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.50) 及び 12 mmol/L ピルビン酸リチウム塩] 30  $\mu$ L を加えて攪拌し、更に 37℃ で 5 分間加温した。LD 活性測定試薬 2 を添加してから約 1 分経過後から 2 分経過後までの波長 340 nm における 1 分間当たりの吸光度変化量を測定した。保存初日の吸光度変化量を 100% として LD 活性の残存率を算出した。

## 【0036】

結果を図 3 に示す。図 3 において、各記号「1W」、「2W」、及び「3W」は、それぞれ、保管開始から 1 週間経過後、2 週間経過後、及び 3 週間経過後の結果であることを意味する。

図 3 に示すように、37℃ 及び 25℃ のいずれの条件下においても、本発明の試薬 B の方が、比較用の試薬 A と比べて、LD 活性の残存率が高かった。

## 【0037】

## 【発明の効果】

本発明の ALT 活性測定試薬によれば、試薬ブランク反応の上昇、すなわち、初期吸光度の上昇を抑制することができるので、正確な ALT 活性測定値を得ることができる。また、LD の安定化効果を有する。

## 【図面の簡単な説明】

## 【図 1】

本発明及び比較用の ALT 活性測定試薬における、ブランク感度の経時的変化を示すグラフである。

## 【図 2】

本発明及び比較用の ALT 活性測定試薬を用いて測定した、プール血清中 ALT 活性測定値の経時的変化を示すグラフである。

## 【図 3】

本発明及び比較用の ALT 活性測定試薬における、LD 安定性を示すグラフで

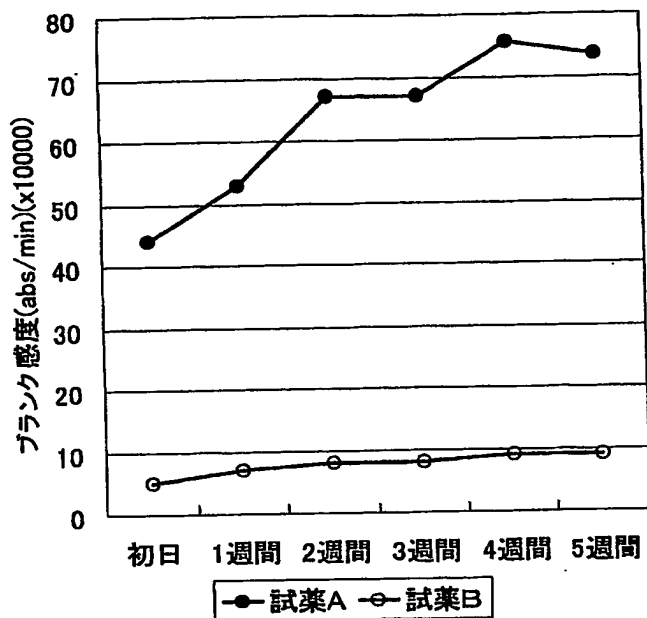
特 2 0 0 2 - 0 6 6 8 1 4

ある。

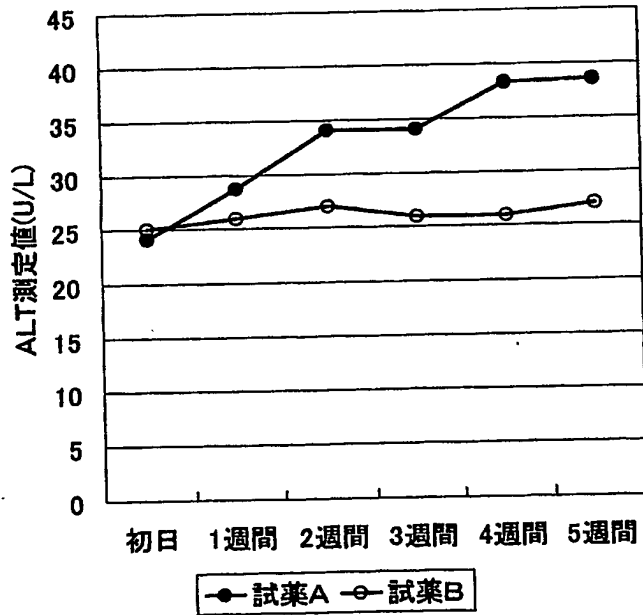


【書類名】 図面

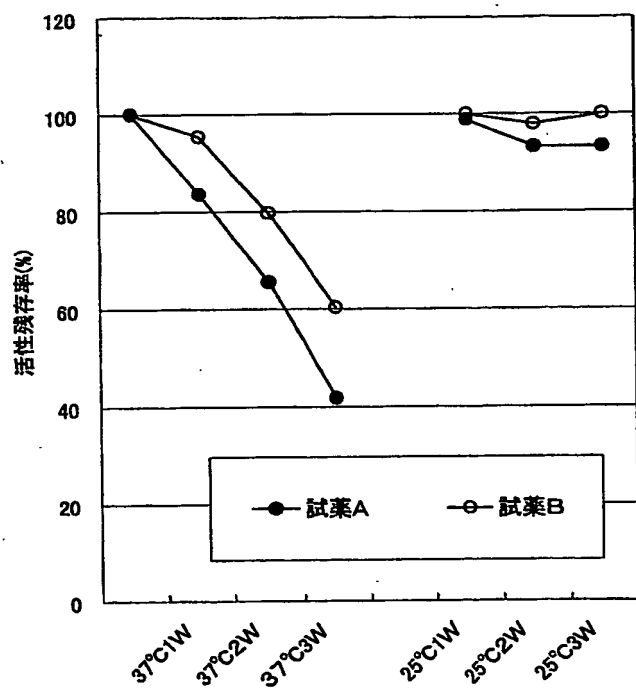
【図1】



【図2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 試薬ブランク反応の上昇、すなわち、初期吸光度の上昇を抑制することのできるアラニンアミノトランスフェラーゼ活性測定試薬及び測定方法を提供する。

【解決手段】 前記測定試薬は、L-アラニン、2-オキソグルタル酸、乳酸脱水素酵素、及び還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを含むアラニンアミノトランスフェラーゼ活性測定試薬において、乳酸脱水素酵素活性に対する阻害作用を有する物質を更に含む。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-066814
受付番号	50200343207
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成14年 3月20日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年 3月12日
-------	-------------

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000138277]

1. 変更年月日 1990年 8月23日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区東神田1丁目11番4号  
氏 名 株式会社ヤトロン